

POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU

Inhibitory białek antyapoptotycznych z rodziny BCL-2 jako związki wzmacniające hamowanie aktywności BRAF^{V600E} w komórkach czerniaka.

Czerniak charakteryzuje się słabą odpowiedzią na dostępne terapie. Hamowanie aktywności kinazy BRAF^{V600E}, której obecność jest charakterystyczna dla 50-70% przypadków czerniaka, poprzez zastosowanie selektywnych inhibitorów znacząco poprawiło możliwości terapeutyczne czerniaka. Inhibitory BRAF^{V600E} hamują podziały komórek nowotworowych, jednak w niewielkim stopniu uruchamiają programowaną śmierć komórki (apoptozę), co może wynikać z wysokiego wyjściowego poziomu ekspresji wielu białek antyapoptotycznych w komórkach czerniaka. Ponadto mechanizmy oporności, istniejące lub rozwijające się podczas stosowania leczenia, zwykle prowadzą do wznowy. Celem projektu jest ocena efektów molekularnych i komórkowych encorafenibu, inhibitora nowej generacji kinazy BRAF^{V600E} w komórkach czerniaka oraz ocena efektywności równoczesnego hamowania BRAF^{V600E} i konkretnych białek antyapoptotycznych z rodziny BCL-2. Jako model badawczy w projekcie będą wykorzystane populacje komórek czerniaka z mutacją BRAF^{V600E}, wyprowadzone z guzów pobranych od pacjentów i rosnące w podłożu zawierającym czynniki wzrostu EGF i bFGF. Taki model przedkliniczny czerniaka pozwala na zachowanie charakterystyki wyjściowego guza oraz utrzymanie zróżnicowania fenotypowego populacji komórek czerniaka pod względem morfologii i aktywności wielu ścieżek sygnałowych istotnych dla rozwoju i progresji tego nowotworu. Efekty encorafenibu zostaną zbadane poprzez ocenę stopnia zahamowania proliferacji komórek oraz indukcji apoptozy i autofagii na poziomie komórkowym i molekularnym, z zastosowaniem mikroskopii obrazującej żywe komórki, cytometrii przepływowej, testu aktywności kwaśnej fosfatazy, Western Blotting i qRT-PCR. Ponadto, niedawno opisana metoda 'Dynamic BH3 Profiling' umożliwi ocenę stopnia uwrażliwiania komórek czerniaka na apoptozę poprzez częściowe hamowanie aktywności białek antyapoptotycznych przez encorafenib. 'Dynamic BH3 Profiling' pozwoli również na wskazanie konkretnych białek antyapoptotycznych z rodziny BCL-2, które chronią odmienne fenotypowo populacje komórek czerniaka przed śmiercią w obecności encorafenibu. Zostanie zweryfikowane, czy hamowanie aktywności poszczególnych białek antyapoptotycznych za pomocą selektywnych niskocząsteczkowych mimetyków BH3 wzmocni indukcję apoptozy w populacjach komórek czerniaka traktowanych encorafenibem. Ocena indukcji apoptozy po zastosowaniu kombinacji badanych związków zostanie przeprowadzona na poziomie komórkowym i molekularnym, m.in. z wykorzystaniem frakcji mitochondrialnej uzyskanej z komórek czerniaka oraz ocenę zmian ekspresji 84 genów związanych z apoptozą, w tym kodujących białka z domeną śmierci, kaspazy, białka z rodziny BCL-2 oraz czynniki transkrypcyjne uczestniczące w regulacji apoptozy. Oczekiwany efektem realizacji projektu jest wskazanie potencjalnych celów terapeutycznych w zakresie podstawowej maszyny antyapoptotycznej, których hamowanie w skojarzeniu z encorafenibem może poprawić odpowiedź kliniczną pacjentów z czerniakiem.